

201324065A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

平成25年度総括・分担研究報告書

研究代表者 峯岸克行

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

平成25年度総括・分担研究報告書

研究代表者 峯岸克行

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

目次

I	班員・研究協力者名簿	5
II	総括研究報告 峯岸克行（徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野教授）	9
III	分担研究報告	
1.	高IgE症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明 峯岸克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野 教授	19
2.	重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植 高田英俊 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 准教授	23
3.	次世代シーケンシングによる高IgE症候群の原因遺伝子の発見 小原 収 独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ グループリーダー	29
4.	高IgE症候群に関与する遺伝要因の探索 玉利真由美 広田朝光 独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム チームリーダー	33
IV	研究成果の刊行に関する一覧表	37
V	代表的な研究成果の刊行物	43

I 班員・研究協力者名簿

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究班 班員・研究協力者名簿

区分	研究代表者	所属等	職名
研究代表者	峯岸克行	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 病態プロテオゲノム分野	教授
研究分担者	高田英俊	九州大学大学院医学研究院成長発達医学・ 小児科学	准教授
	小原 収	理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ	グループ ディレクター
	玉利真由美	理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム	チームリーダ ー
研究協力者	広田朝光	理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム	研究員
事務局	峯岸克行	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 病態プロテオゲノム分野 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15 TEL 088-633-9152, FAX 088-633-9155 e-mail:yminegishi@genome.tokushima- u. ac. jp	教授
経理事務担 当者	大西一也	徳島大学財務部蔵本会計事務センター室 第二経理係 〒770-8503 Tel: 088-633-9554 Fax: 088-633-9555 e-mail: krakai2c@tokushima-u. ac. jp	係長

Ⅱ 総括研究報告

総括研究報告

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

研究代表者 峯岸克行

(徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野教授)

研究要旨

本先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究班は、免疫不全症の病態解明と予後改善を目的として以下の研究を行った。

(1) 高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎と血清 IgE の著しい高値に黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎を合併する先天性免疫不全症である。STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (DN) 変異が原因で発症することは最近明らかになったが、その病態形成機構は明らかになっていない。そこでアトピー性皮膚炎の発症メカニズムを検討するためにモデルマウスを用いてアトピー性皮膚炎モデルを作成する検討を行った。このハプテンを反復塗布するモデルにおいては、皮膚組織の肥厚、CD4 陽性 T 細胞と好酸球の皮膚炎局所への浸潤、ハプテン特異的血清 IgE、Th1/Th2 サイトカイン上昇を認め、ヒトのアトピー性皮膚炎と同様の病変を作成することに成功した。この皮膚炎モデルは、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明に有用である可能性が示唆された。

(2) 重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植

重症複合免疫不全症は、代表的な先天性免疫不全症の1つで、生後早期に造血幹細胞移植を行うことができれば、その予後は良好である。出生当日に診断し移植前処置なしで臍帯血移植を行った CD3 δ 欠損症の2症例に対して、移植後の免疫学的再構築の長期的経過を検討した。移植は大きな合併症もなく、直後より T 細胞数の増加も認められた。common γ 鎖欠損症の場合と異なり、CD3 δ 欠損症患者では、前処置なしでの造血幹細胞移植でも免疫グロブリン値は正常を保ち、抗体産生能も正常に認められた。一方、長期的には、T 細胞数や PHA に対するリンパ球幼若化反応は正常よりもやや低値で推移し、TREC も低値であった。現在それぞれ9歳、5歳で生存しており、QOL も良好である。

(3) 次世代シーケンシングによる高 IgE 症候群の原因遺伝子の発見

本研究では、先天性免疫不全症候群の中でも、高 IgE 症候群に特に焦点を当て、その疾患群の予後予測判定因子の同定を行い、本疾患の病態を解析する。それによって、単一遺伝子の異常によって生じる多様な病態の発症機序を探り、骨粗鬆症、アトピー性皮膚炎、高 IgE 血症などの新規の診断法、治療法とケア、予後予測に結びつけることを目指す。特にこの今年度の分担研究では、高 IgE 血症の臨床検体の全エクソン解析に集中し、全エクソン解析結果から各症例の候補変異の蓄積を進めた。

(4) 高IgE血症に関与する遺伝要因の探索

高IgE症候群はアトピー性皮膚炎、高IgE血症などの病態を呈する先天性免疫不全症である。近年、その原因としてSTAT3、TYK2の遺伝子変異が同定されたが、その臨床経過は様々であり、さらなる遺伝要因の解明が待たれている。またしばしば高IgE症候群は重症アトピー性皮膚炎との鑑別は困難であり、両者に共通の遺伝要因が存在する可能性がある。本研究は高IgE血症の遺伝要因を詳細に明らかにするとともに、アトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定することを目的とする。本年度は日本人のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により同定された8つのゲノムワイド水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) をみたく疾患関連領域について、重症アトピー性皮膚炎症例(血清IgE値 >10000 IU/ml) 149例について関連解析を行った。その結果、2ヶ所の領域、GLB1-CCR4領域(rs6780220、 $P=1.6 \times 10^{-4}$)、IL1RL1-IL18R1-IL18RAP領域(rs13015714、 $P=2.1 \times 10^{-4}$)で強い関連を認めた。

分担研究者

高田英俊・九州大学大学院医学研究院成長発達医学・小児科学分野准教授

小原 収・独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ グループリーダー

玉利真由美 独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム チームリーダー

研究協力者

広田朝光 独立行政法人理化学研究所 統合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム研究員

I. 研究の目的

先天性免疫不全症は、ヒト免疫系遺伝子の異常が原因で発症する疾患である。代表的な病型だけでも約40種存在するが、最近同一の遺伝子異常があっても軽症例と重症例があり、予後の予測が困難であることが明らかになってきた。本研究では、先天性免疫不全症の詳細な検討を行い、その臨床症状、免疫能、遺伝子多型を検討することにより、予後因子を明らかにし、各症例に適切な個別化医療を提供する基盤を整備することを最大の目的とする。その突破口として、申請者が原因遺伝子を最近発見した高IgE

症候群を対象とし、次に、先天性免疫不全症全体で同様の検討を行う。本研究の特色・独創的な点は、申請者が高IgE症候群の原因を世界で最初に見出し、さらに同じ遺伝子異常が存在するにもかかわらず、重症型と軽症型が存在することを見出したことがある。これに関する先行研究は存在せず、本研究は世界をリードする。

我々がSTAT3のドミナントネガティブ変異が原因であることを世界で初めて発見した。その病態を明らかにしてきた。さらに、すでに高IgE症候群のマウスモデルを樹立している。しかし、本症の重症アトピーとの

鑑別は困難で、病因と病態形成機構は不明の点が多く、治療には多くの課題が残されている。さらに、同じSTAT3の遺伝子変異を有する症例であっても、一部の症例においては早期から肺の器質的疾患が進行し、20歳代で死亡する症例が多数存在する。一方で対症療法のみで肺の器質的病変が出現せず、良好な経過をとる症例もある。初年度と次年度でこの予後不良群と予後良好群を臨床的、遺伝学的、免疫学的方法で精査することより鑑別する方法を見出し、それぞれに対して適切な個別化医療の基盤を構築することが本研究計画の最重要の目的である。さらに、初年度と次年度で病態形成機構の解明を進めていく。

II. 研究方法

(1) 高 IgE 症候群の病態形成機構の解明
我々が樹立したSTAT3-DNを全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、各種の皮膚炎誘発モデルの検討を行った。このモデルマウスにおいては、高 IgE 血症が自然に発症し、Th17 サイトカインの産生低下が見られ、黄色ブドウ球菌による皮膚感染症を自然発症し、アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しないことが明らかになっている。そのため、各種の誘発性皮膚炎の検討を行った。具体的には、1) ハプテン単回投与による皮膚炎モデル、2) ハプテン反復投与による皮膚炎モデルの検討を行った。

ハプテン単回投与による皮膚炎では、day -6 にハプテンを剃毛したマウス腹部に塗布・感作し、day 0 に片側耳介にハプテンを、もう一方の耳介に溶媒のみを塗布、耳介腫脹を（ハプテンと溶媒を塗布した耳介の厚さ）－（ハプテンの溶媒のみを塗布した耳介の厚さ）として測定した。ハプテン反復投与

による皮膚炎モデルでは、day -6 にハプテンを腹部に塗布感作し、day 0 より隔日で10回耳介にハプテンを塗布した。これらの炎症誘発操作後に皮膚よりコラゲナーゼ処理により皮膚局所の細胞を取り出し、その細胞表面形質を検討し、さらにその細胞のサイトカインやケモカイン産生を評価した。

(2) 重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植

重症複合免疫不全症の造血幹細胞移植後、血清 IgGAM、末梢血リンパ球サブセット解析、リンパ球機能解析、ワクチン接種後の特異抗体産生能解析を行った。B細胞の純化には、末梢血短各級から B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech) を用い、キメリズム解析は異性間 FISH 法により行った。

(3) 次世代シーケンシングによる高IgE症候群の原因遺伝子の発見

全エクソンシーケンシングを研究代表者から提供された検体について実施し、その情報解析パイプラインを稼働させ、遺伝子変異情報を構築したローカルに稼働する情報解析ツールを介して共有する。公的に利用できる1塩基多様性情報（特に日本人健常者の1塩基多様性情報）と研究分担者が蓄積した日本人1塩基多様性情報の両者を統合し、それらと得られた高IgE血症疾患症例に見られた変異情報を比較することで、発症原因となる候補変異を絞り込む。

(4) 高IgE血症に関する遺伝要因の探索
昨年度より重症アトピー性皮膚炎症例で、関連解析を行っているが、本年は症例数を増やし、これまで日本人のゲノムワイド関連解析(GWAS)により8つのゲノムワイド水準($P < 5 \times 10^{-8}$)をみたす疾患関連領域(IL1RL1-IL18R1-

IL18RAP、MHC、OR10A3-NLRP10、GLB1-CCR4、CCDC80、CARD11、ZNF365-EGR2、CYP24A1-PFDN4)のSNPsについて、アトピー性皮膚炎で高IgE(>10000IU/ml)血症を伴う症例(149例)とコントロール(1474例)で関連解析を行なった。タイピングはTaqMan法およびInvader法により実施した。

III 研究結果と考察

(1) 高 IgE 症候群の病態形成機構の解明
高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎、アトピー性皮膚炎と血清 IgE の著しい高値を合併する先天性免疫不全症である。その主要な原因が STAT3 のドミナントネガティブ(DN)変異であることが明らかになったが、その病態形成機構には多くの不明な点が残されている。今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、ハプテン反復投与による皮膚炎モデルがヒトのアトピー性皮膚炎と類似した病態を形成することが明らかになった。今後この皮膚炎モデルと各種の遺伝子改変マウスを用いて、その病態形成機構を明らかにしていくことが可能になった。各種の遺伝子改変マウス(T細胞とB細胞を欠損するRag2欠損マウス、B細胞を欠損する μ MTマウス、高親和性IgEレセプターを欠損するFc ϵ RI欠損マウス、マスト細胞を欠損するKit^{w-sh/w-sh}マウス、好塩基球を欠失するMcpt8-DTRマウス等)とStat3-DNマウスを交配することにより、Stat3-DNにより発症するアトピー性皮膚炎の原因を明らかにすることが可能になった。

(2) 重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植

2名のCD3 δ 欠損症患者において、前処置なしで、HLA一致非血縁者間造血幹細胞移植

を行った。造血幹細胞移植後易感染性は改善した。T細胞機能回復が見られたが、T細胞数およびT細胞機能上は、正常範囲以下であった。この原因としては、CD3 δ 欠損症の場合、胸腺に残存するレシピエントの未熟T細胞が、ドナーT細胞の分化を制限している可能性が考えられた。胸腺でのT細胞新生能を示すT-cell receptor excision circles DNA量を測定した結果、二名の患者ではいずれも検出感度以下であり、これを支持するものと考えられる。血清免疫グロブリン濃度および特異抗体産生能は、移植後に正常に認められた。B細胞は100%レシピエント由来であることより、CD3 δ 欠損症で前処置なしで移植した場合、ドナーT細胞とレシピエントB細胞の相互作用によって抗体産生能が回復することが明らかになった。しかし、細胞性免疫能を完全に正常化させるためには、移植前処置が必要な可能性が示唆された。

(3) 次世代シーケンシングによる高IgE症候群の原因遺伝子の発見

本研究では、先天性免疫不全症候群の中でも、高IgE症候群に特に焦点を当て、その疾患群の病因の同定を行い、本疾患の病態を解析する。それによって、単一遺伝子の異常によって生じる多様な病態の発症機序を探り、骨粗鬆症、アトピー性皮膚炎、高IgE血症などの新規の診断法、治療法とケア、予後予測に結びつけることを目指す。特にこの分担研究では、高IgE血症の臨床検体のゲノクス解析により、各症例における遺伝的変異情報を解析することを目的とした。

(4) 高IgE血症に関与する遺伝要因の探索

高 IgE 症候群はアトピー性皮膚炎、高 IgE 血症などのアレルギー病態を伴う先天性免疫不全症である。近年、その原因として STAT3 の遺伝子変異が同定されたが、その臨床経過は様々であり、さらなる遺伝的要因の解明が待たれている。またしばしば高 IgE 症候群は重症アトピー性皮膚炎との鑑別が困難であり、両者に共通の遺伝的要因が存在する可能性がある。本研究は高 IgE

血症の遺伝的要因を詳細に明らかにするとともに、アトピー性皮膚炎に関連する遺伝子群を同定することを目的とする。本年度は重症アトピー性皮膚炎症例(血清 IgE 値 >10000IU/ml)に着目して関連解析を行い、CCR4 近傍の SNP との間に強い関連 ($P=2.5 \times 10^{-7}$) があることを認めた。今後、STAT3 変異高 IgE 症候群症例において CCR4 近傍の SNP の検討を行う。

Ⅲ 分担研究報告書

高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明

峯岸克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野 教授

研究要旨

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値と、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎を特徴とする先天性免疫不全症である。その主要な原因が STAT3 の遺伝子変異であることが明らかにされたが、その病態形成機構には不明な点が多い。今回我々は、高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎の発症機構を解明する目的で、STAT3-DN (dominant negative) を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、アトピー性皮膚炎モデルの検討を行った。各種の皮膚炎症モデルを検討した結果、ハプテン反復塗布により誘発する皮膚炎において、STAT3-DN モデルマウスでは野生型の対照と比較して、皮膚組織の肥厚、皮膚バリア機能の低下、CD4 陽性 T 細胞と好酸球の皮膚炎局所への浸潤がより増強し、ハプテン特異的 IgE、Th2 サイトカイン産生がより上昇した。この症状はヒトで報告されているアトピー性皮膚炎の症状とよく一致していた。この皮膚炎モデルは、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明に有用である可能性が示唆された。

A. 研究の目的

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値を呈し、高頻度に黄色ブドウ球菌による皮膚と肺の感染症を合併する原発性免疫不全症である。その原因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) 変異であることが近年明らかになった。高 IgE 症候群では、そのほぼ全例でアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を発症する。すなわち、ヒトにおける STAT3 の機能低下はアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を引き起こす。しかし、STAT3-DN 変異がどのようなメカニズムでこれらのアトピー症状を発症するかは現時点では世界的にも全く明らかにされておらず、そのため本症のアトピーには、対症療法以外の治療法は存在しない。また、一般のアトピー性皮膚炎では、高頻度で黄色ブドウ球菌が常在しており、高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎発症と黄色ブドウ球菌感染症とに関連がある可能性が

ある。本研究では、STAT3-DN により発症するアトピー性皮膚炎の発症機構を解明し、その新規の治療法を開発することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

我々が樹立した STAT3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、各種の皮膚炎誘発モデルの検討を行った。このモデルマウスにおいては、高 IgE 血症が自然に発症し、Th17 サイトカインの産生低下が見られ、黄色ブドウ球菌による皮膚感染症を自然発症し、アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しないことが明らかになっている。そのため、各種の誘発性皮膚炎の検討を行った。具体的には、1) ハプテン単回投与による皮膚炎モデル、2) ハプテン反復投与による皮膚炎モデルの検討を行った。

ハプテン単回投与による皮膚炎では、day

-6 にハプテンを剃毛したマウス腹部に塗布・感作し、day 0 に片側耳介にハプテンを、もう一方の耳介に溶媒のみを塗布、耳介腫脹を（ハプテンと溶媒を塗布した耳介の厚さ）-（ハプテンの溶媒のみを塗布した耳介の厚さ）として測定した。ハプテン反復投与による皮膚炎モデルでは、day -6 にハプテンを腹部に塗布感作し、day 0 より隔日で10回耳介にハプテンを塗布した。これらの炎症誘発操作後に皮膚よりコラゲナーゼ処理により皮膚局所の細胞を取り出し、その細胞表面形質を検討し、さらにその細胞のサイトカインやケモカイン産生を評価した。

C. 研究結果

1. ハプテン単回投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテンで感作し、片側耳介にハプテン塗布、対側耳介に溶媒のみを塗布し、1日後の耳介腫脹を測定すると、Stat3-DN マウスでは野生型マウスと比較してハプテン塗布側の耳介腫脹は軽度だった。この時の Stat3-DN マウスの皮膚局所においては、IFN γ の産生は同等であったが、IL-17 の産生が低下していた。このため、T細胞の産生する Th17 サイトカインの低下が、耳介の腫脹の軽減を引き起こしている可能性が考えられた。このことは、STAT3 の遺伝子異常を有する高 IgE 症候群患児においては、接触性皮膚炎が発症しにくい可能性を示唆していると考えられた。

2. ハプテン反復投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテンで感作し、片側耳介にハプテンを対側耳介に溶媒を隔日で継続塗布すると、ハプテン塗布4回後までは Stat3-DN マウスでは野生型マウスと比較し

て耳介腫脹は軽度だったが、それ以降では Stat3-DN マウスで野生型マウスと比較して増強していた。組織学的には、角質、表皮には明らかな相違は認めなかったが、真皮への細胞浸潤が Stat3-DN マウスで増強していた。また、経皮水分蒸散量 (TEWL) により評価した表皮バリア機能も Stat3-DN マウスでより低下していた。皮膚浸潤細胞を比較すると、Stat3-DN マウスにおいて、CD4 陽性 T 細胞、好酸球、好塩基球の皮膚炎局所への浸潤の増加と好中球の浸潤の低下が認められた。これらの細胞の産生する Th1 と Th2 のいずれのサイトカインも増加していた。また、CXCL9, CXCL10 などの Th1 ケモカイン、CCX17, CCL22, CCL5 などの Th2 ケモカインが Stat3-DN マウスで増加していた。さらに、Stat3-DN マウスでは、抗原特異的血清 IgE 濃度の上昇も認められ、全体として Th2 型の皮膚炎が誘導されているものと考えられた。このモデルマウスで見られた細胞浸潤、表皮バリア機能の低下、サイトカイン、ケモカイン、免疫グロブリン産生のパターンはヒトのアトピー性皮膚炎とよく一致していた。

考察

STAT3 のドミナントネガティブ変異により発症する高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の合併が臨床的特徴である。しかし、その病態形成機構は不明で、治療法も対症療法に限られていた。今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、ハプテン反復投与による皮膚炎モデルがヒトのアトピー性皮膚炎と類似した病態を形成することが明らかになった。今後この皮膚炎モデルと各種の遺伝子改変マウスを用いて、その病態形成機構を明らかにし

ていく。

E. 結論

本研究により、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎発症メカニズムを検討するために必要なモデル皮膚炎を確立した。今後、このモデルを用いて、各種の遺伝子改変マウス (T 細胞と B 細胞を欠損する Rag2 欠損マウス、B 細胞を欠損する μ MT マウス、高親和性 IgE レセプターを欠損する Fc ϵ RI 欠損マウス、マスト細胞を欠損する Kit^{w-sh/w-sh} マウス、好塩基球を欠損する Mcpt8-DTR マウス等) と Stat3-DN マウスを交配し、このマウスを用いて我々の確立した皮膚炎モデルの検討を行い、Stat3-DN とアトピー性皮膚炎の関係を明らかにする。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 2nd symposium of the University of Tokushima "Immune system development, deviation, and regulation" Nichia Medical Hall, Tokushima University, Tokushima, Jan 24-25, 2013
2. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 4th Japanese Society of Hematology "Dysfunction and Neoplasia of lymphocytes" Yamatoya Honten, Ehime, May 24-25, 2013
3. 峯岸克行 アレルギーを合併する免疫不全症 高 IgE 症候群の病因と病態 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013 年 4 月 21 日 広島 シンポジウム Primary immunodeficiency 2013

update; Current topics and new concepts

4. 峯岸克行 アトピー性皮膚炎を合併する免疫難病の病態解明 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2013 年 12 月 1 日 金沢

2. 論文発表

1. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory monocytes recruited to allergen-exposed skin acquire an anti-inflammatory property via basophil-derived IL-4. *Immunity* 38, 570-580, 2013
2. Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Tsutsui H, Nei Y, Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Ohta N, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminthes. *J Exp Med* 210, 2583-2595, 2013
3. 峯岸克行 STAT3 の異常によるアトピー性皮膚炎の発症機序 臨床・免疫アレルギー科 59, 160-164, 2013
4. 峯岸克行 高 IgE 症候群の最近の話題 Medical Science Digest 39, 7-8, 2013
5. 峯岸克行 抗体産生不全症—B 細胞不全症 小児科診療 76 419-423, 2013
6. 峯岸克行 朝倉書店内科学 第 10 版

原発性免疫不全症 1371-1378 総編集
矢崎義男

9. 峯岸克行 小児内科 高 IgE 症候群
45, 1146-1147, 2013

7. 峯岸克行 Jak-Stat シグナルとアレルギー
一制御 実験医学 31, 113-117, 2013

H. 知的財産権の出願登録状況
該当なし

8. 峯岸克行 高 IgE 症候群に見られる易感
染性 化学療法の領域 29, 2429-
2434, 2013

重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植

研究分担者 高田英俊 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 准教授

研究要旨

重症複合免疫不全症は、代表的な先天性免疫不全症の1つで、生後早期に造血幹細胞移植を行うことができれば、その予後は良好である。出生当日に診断し移植前処置なしで臍帯血移植を行ったCD3 δ 欠損症の同胞2名に対して、移植後の免疫学的再構築の長期的経過を検討した。移植は大きな合併症もなく、T細胞の増加も認められた。共通 γ 鎖欠損症の場合と異なり、CD3 δ 欠損症患者では、前処置なしでの造血幹細胞移植でも免疫グロブリン値は正常を保ち、抗体産生能も認められた。他方、長期的には、T細胞数やPHAに対するリンパ球幼若化反応は正常よりもやや低下傾向を示し、TRECも低値であった。現在それぞれ9歳、5歳で生存しており、QOLも良い。

A. 研究目的

重症複合免疫不全症は、乳児期に感染症でほとんどの患者が死亡する重症の原発性免疫不全症候群であり、造血幹細胞移植や遺伝子治療による免疫学的再構築が緊急に行われる必要がある。しかし、患者が診断された時点で既に重症感染症を発症している場合も多く、また病型によって最適な移植方法も異なると考えられており、病型や病像に応じた最適な移植方法が確立されていない。

CD3 δ 欠損症は、胸腺内でのT細胞分化が障害されるタイプの重症複合免疫不全症であり、重症複合免疫不全症の中で最も頻度が高い共通 γ 鎖欠損症と異なり、胸腺の大きさが保たれ、胸腺内には未熟なT細胞が存在していることが特徴である。またB細胞やNK細胞自体には機能的には異常を認めない点も共通 γ 鎖欠損症とは異なっている。これらの特徴から、CD3 δ 鎖欠損症

に対する適切な造血幹細胞移植法は、共通 γ 鎖欠損症とは異なることが予想されている。今回我々は、家族歴から出生当日にCD3 δ 欠損症と診断し、前処置なしで造血幹細胞移植を行った兄弟の、免疫学的再構築の長期的な経過を詳細に検討した。

B. 研究方法

CD3 δ 欠損症の造血幹細胞移植後、定期的に、末梢血リンパ球サブセット解析、リンパ球機能解析、ワクチン接種後の特異抗体産生能を行った。B細胞の純化には、末梢血MNCからB Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech) を用い、キメリズム解析は異性間FISH法を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

患者の臨床像、経過は以下の通りである。
 患者 1: 姉が乳児期早期に重症複合免疫不全症と診断され、造血幹細胞移植を受けたが、サイトメガロウイルスによる肺炎、脳炎にて死亡した。その際の遺伝子解析から、CD3 δ 欠損症と診断された。

患児は 0 生日時に、末梢血 T 細胞が欠損していたため重症複合免疫不全症と診断され、遺伝子検査にて CD3 δ 欠損症であることが判明した。30 生日に、HLA 一致非血縁者間臍帯血移植を行った。前処置は施行しなかった。

患者 2: 患者 1 の弟。同様に 0 生日時に、末梢血 T 細胞が欠損していたため重症複合免疫不全症と診断され、遺伝子検査にて CD3 δ 欠損症であることが判明した。25 生日に、HLA 一致非血縁者間臍帯血移植を行った。前処置は施行しなかった。

臍帯血移植後の T 細胞の回復は CD4 陽性 T 細胞有意に認められたが、数年を経過して、CD8 陽性 T 細胞の割合は増加してきた。

血清 IgA と IgM は造血幹細胞移植後、比較的速やかに回復した (図 1)。

図 1. 患者血清 IgA と IgM 値の推移

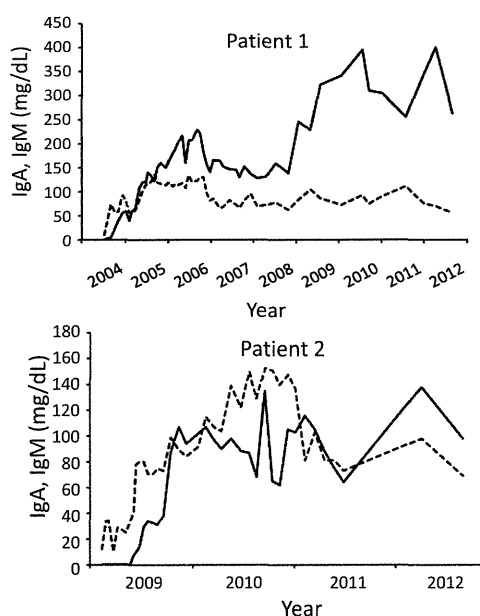
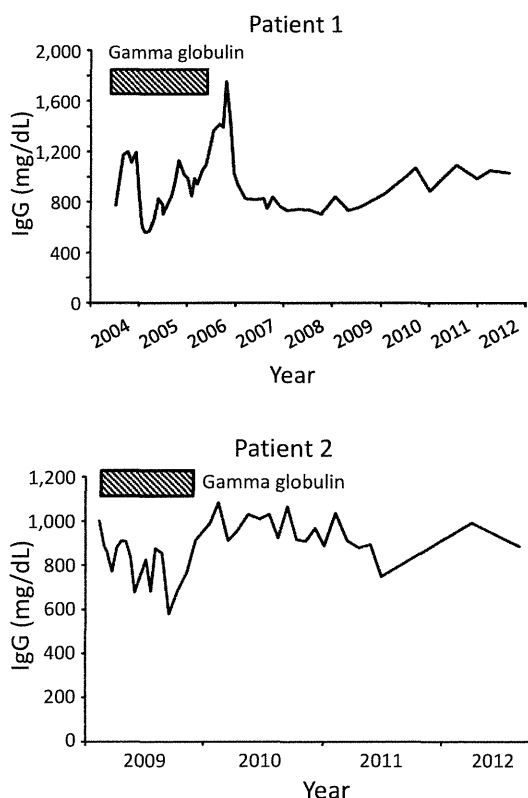


図 2. 患者血清 IgG の推移



Shaded bar は、gamma globulin を補充していた期間を示す。

また、造血幹細胞移植前後に、ガンマグロブリンを継続的に補充していたが、次第にガンマグロブリン補充なしでも、血清 IgG が維持できるようになった (図 2)。重症複合免疫不全症で最も頻度が高い、X-SCID (共通 γ 鎖欠損症) では、前処置なしで造血幹細胞移植を行った場合、ほとんどの例で、抗体産生能が回復しない。従って、CD3 δ 欠損症患者で前処置なしで造血幹細胞移植を行った場合でも抗体産生能が回復することは、X-SCID とは極めて対照的である。

T-B+ の重症複合免疫不全症で、前処置なしで造血幹細胞移植を行った場合、T 細胞はドナー由来、B 細胞はレシピエント由来である、いわゆる Split chimera の状態になると考えられている。今回、CD3 δ 欠損症で、

前処置なしの移植後に抗体産生能が見られた理由として、ドナー由来の B 細胞の割合が高く、ドナー由来の T 細胞とドナー由来の B 細胞との間の相互作用する割合が高かった可能性がある。この点を明らかにするために、Patient 2 の末梢血から、B 細胞を純化し、異性間 FISH 法で、ドナー由来の B 細胞の割合を調べた。

図 3 に示すように、純化した B 細胞の割合は、99.9%であった。

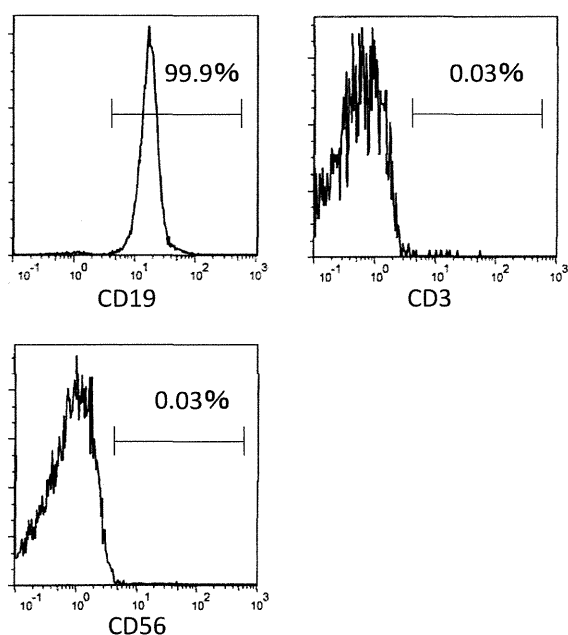


図 3. 純化した細胞における CD19 陽性細胞、CD3 陽性細胞、CD5 陽性細胞の割合

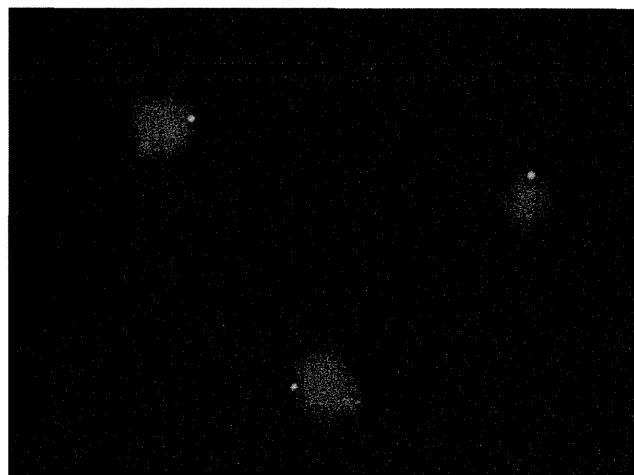
異性間 FISH 法で解析した結果、B 細胞は 100%レシピエント型であった (図 4)。

図 4. 純化した B 細胞での異性間 FISH 法解析

静止核500細胞を分析した結果、
 ・ XY (男性型) のシグナルを認めた . . . 500細胞
 ・ XX (女性型) のシグナルを認めた . . . 0細胞

【ゲノム状況】

	XY	XX	TOTAL
被検検体	500	0	500
control	100	0	100



従って、移植後の B 細胞は、ほぼ 100%がレシピエント由来であることが確認された。

D. 考察

2名の CD3 δ 欠損症患者において、前処置なしで、HLA 一致非血縁者間造血幹細胞移植を行い、その長期的な免疫能について評価を行った。造血幹細胞移植後易感染性なかった。T 細胞の回復が見られたが、T 細胞数および T 細胞機能上も、正常範囲以下で推移していた。この原因としては、CD3 δ 欠損症の場合、胸腺においてレシピエントの未熟 T 細胞が残存しており、ドナー T 細胞の分化が制限されてしまうことが考えられた。胸腺での T 細胞診性能を示す T-cell receptor excision circles DNA 量を測定した結果、二名の患者ではいずれも検出感度以下であり、これを支持するものと考えられる (Data not shown)。

血清免疫グロブリン濃度および特異抗体産生能は、臍帯血移植後に正常に認められることが確認された。異性間 FISH 法で解析した結果、B 細胞はほぼ 100%レシピエント由来であることを確認した。CD3 δ 欠損症で前処置なしで移植した場合、ドナー T 細胞とレシピエント B 細胞の相互作用によって抗

体産生能が回復することが確認された。

E. 結論

CD3 δ 欠損症患者2名において、前処置なしでのHLA一致臍帯血移植を行い、現在まで易感染性はなく、QOLも良い状態である。前処置なしでも抗体産生能を回復させることができた。細胞性免疫能を正常化させるためには、移植前処置が必要な可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Ninomiya T, Takada H, Nagatomo Y, Nanishi E, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Ikeda I, Hara T: Development of Kawasaki disease in a patient with PFAPA. *Pediatrics International* 2013, 55: 801-2
2. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T: The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J.* 11(1): 41, 2013
3. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* 23(3): 425-9, 2013
4. Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S: Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). *Clin Exp Rheumatol.* 31: 302-9, 2013
5. Takada H. Primary immunodeficiency in Japan; Epidemiology, Diagnosis, and Pathogenesis. *Pediatrics International. Pediatr Int.* 55: 671-4, 2013
6. Muñoz-Ruiz M, Pérez-Flores V, Garcillán B, Guardo AC, Mazariegos MS, Takada H, Allende LM, Kilic SS, Sanal O, Roifman CM, López-Granados E, Recio MJ, Martínez-Naves E, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. Human CD3 γ , but not CD3 δ , haploinsufficiency differentially impairs $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ surface TCR expression. *BMC Immunol* 21; 14:3, 2013
7. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98: 355-60, 2013

学会発表

1. Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Ohga S, Hara T